

培養ヒト動脈壁平滑筋細胞のDNA合成に及ぼす低比重リポ蛋白(LDL)の作用

著者	生井 一之
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54894

①

博士論文

培養ヒト動脈壁平滑筋細胞の
DNA合成に及ぼす低比重リポ蛋白
(LDL)の作用

東北大学医学部附属病院第三内科

生井 一之

I. はじめに

粥状動脈硬化症の発症には、1) 動脈壁への脂質、特にコレステロールエステルの沈着と泡沫細胞の出現、2) 中膜平滑筋細胞(SMC)の内皮下への遊走、増殖が重要な役割を果たしている。病理学的には、粥状動脈硬化巣の初期病変(脂肪班)の形成には、マクロファージ由来の泡沫細胞が主要な役割を果たしていると考えられているが、線維性硬化巣や複合病変と進展していくに従い、SMCは肥厚した内膜の主要な細胞構成成分となる¹⁾。SMCの内皮下への遊走と増殖には、血小板由来増殖因子(Platelet derived growth factor; PDGF)²⁾を初めとして、動脈硬化巣に存在する種々の細胞成分より放出される増殖因子³⁻⁵⁾やサイトカイン、動脈壁へ浸透した血漿成分などが複合して作用していると考えられている。

臨床的には、高コレステロール血症、特に高低比重リポ蛋白(Low density lipoprotein; LDL)血症と動脈硬化性疾患との因果関係について、多数の疫学調査より、LDL-コレステロール値が高いほど動脈硬化性疾患の罹病率が高いことが示されている^{6,7)}。実験的には、高脂血清由来のLDLはSMCの増殖を促進すると報告されている^{8,9)}。LDLのSMCに対する増殖促進の機序については、膜合成に必要なコレステロールが供給されること¹⁰⁾などが考えられている。そこで、本研究では、動脈壁平滑筋細胞の³H-thymidineのDNAへの取り込みに対するLDLの促進効果は、コレステロールが過剰に供給されることが関与しているかについて、培養ヒト動脈壁平滑筋細胞を用いて以下の検討を行った。

すなわち、実験1では、LDLの脂質組成差により、SMCの³H-thymidineのDNAへの取り込みが影響されるかについて検討した。実験2では、コレステロールの影響を除き、LDLの蛋白部分であるapoB-100の作用を検討する目的で、LDLを部分的に脱脂して、SMCの³H-thymidineのDNAへの取り込みに対する作用を検討した。

II. 対象

実験1の対象は、正脂血症者(N群)8例、IIa型高脂血症者(IIa群)7例、IIb型高脂血症者(IIb群)6例、ヘテロ型家族性高コレステロール血症者(FH群)10例、IV型高脂血症者(IV群)4例の計35例(Table 1)で、糖尿病者は除外した。各高脂血症の診断は、Table 2に従って行い、FHの診断基準は厚生省難治性高脂血症研究班の基準¹¹⁾に従った。FH 10例のうち、8例がIIa型、2例がIIb型であった。

実験2の対象は、正脂血症者2例および、未治療のヘテロ型FH 2例、IIa型高脂血症者1例である。

III. 方法

対象症例の静脈より早朝空腹時に採血を行い、EDTA-2Na(0.1%)、NaN₃(0.04%)を加えた。その後、ただちに遠心(1,000×g, 15min, 4℃)し、血漿を分離した。Hatch and Leesの超遠心法¹²⁾に従って、比重1.019~1.063分画をLDLとして採取した。また、正常者血漿より超遠心法に従って、比重1.21以上の分画をリポ蛋白欠如血漿(Lipoprotein deficient plasma; LDP)として採取した。LDL、LDPともに、48時間の透析(0.15M NaCl, 0.3mM EDTA-2Na, 1mM HEPES, pH7.4)後、Milipore filter(0.22μm)にて濾過滅菌した。血漿およびLDL分画の総コレステロール(TC)¹³⁾、遊離コレステロール(FC)¹⁴⁾、中性脂肪(TG)¹⁵⁾、リン脂質(PL)¹⁶⁾の各濃度は酵素法、蛋白濃度はLowry法¹⁷⁾にて測定し、エステル型コレステロール(EC)濃度はTCとFCの差に1.68を乗じた値¹⁸⁾とした。また、LDLの一粒子あたりの脂質及び蛋白の割合を比較する目的で、対象のLDLのEC、FC、TG、PL、アポ蛋白の重量比を算出した。

実験2における対象症例のLDL粒子中のコレステロールを除去する目的で、LDLの脱脂を行った。LDLの蛋白部分であるapoB-100は疎水性の蛋白であるため、LDLを完全に脱脂すると水に不溶性になる。培地中に添加できる水溶性の脱脂LDL溶液を得るため、Innerarityら

の方法¹⁹⁾に準じて、リン脂質の一部を残存させた部分的脱脂(脱脂LDL)を行った。方法は蛋白量として1mgのLDLを0.05Mホウ酸バッファー、pH 8.1に溶解し、総量を2.5mlとした。この溶液に約20mlのdiethyl etherを加え、約20時間ゆるやかに攪拌した。この操作後、上層のdiethyl ether層を吸引し、再度約20mlのdiethyl etherを加えて洗浄した。この操作を2~3回繰り返す、真空吸引にてdiethyl etherを完全に除去した後に、透析、濾過滅菌して実験に用いた。

脱脂LDLの0.1%ドデシル硫酸ナトリウム含有3%ポリアクリルアミド電気泳動(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)はKaneらの方法²⁰⁾に準じて、tube gelを用いて行った。

ヒトSMCは代謝疾患のない患者の外科手術で得られた臓器動脈を用い、Rossらの方法²¹⁾に準じ、explant法にて培養した。継代は10%ウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI 1640培地(GIBCO, New York)を用いて、培地交換を週2回行った。継代3から7代の細胞を実験に用いた。

³H-thymidineの取り込み実験は、細胞数を 0.2×10^5 個/mlに調整し、1mlの細胞浮遊液を24 well multidish (Nunc, Roskilde)に分注して行った。5%LDPを含むMEM培地(GIBCO)1mlにて48時間培養後、同量の5%LDP・MEM培地、及びLDLまたは脱脂LDLを含む5%LDP・MEM培地に置換した。実験1では、蛋白量で25 μ gのLDLを添加した。添加LDLの容量は $23.8 \pm 6.1 \mu$ l (Mean \pm SD)であった。実験2では、蛋白量5、10、25、50 μ gの脱脂LDLを添加し、それぞれの添加した容量(Mean \pm SD)は、 13.5 ± 4.8 、 27.0 ± 9.5 、 67.4 ± 23.8 、 $134.6 \pm 47.2 \mu$ lであった。同時に0.5 μ Ciの[methyl-³H]-thymidine(New England Nuclear, USA)を添加した。³H-ThymidineのDNAへの取り込み量の検討は、³H-thymidine添加後36時間の培養が必要と報告²²⁾されているため、培養時間は36時間とした。36時間の培養後、リン酸バッファーにて2回細胞を洗浄し、10%トリクロロ酢酸不溶画分を0.1N NaOH 1mlにて溶解した。溶液0.5mlをAquazol 2 (New England Nuclear) 5ml

に添加し、液体シンチレーションカウンターにて細胞内放射活性を測定した。実験は triplicateで行い、結果はその平均値とした。 ^3H -thymidineの取り込み実験は、実験1では16回、実験2では3回行った。成績は、異なる実験間での比較検討のため、各実験培地での ^3H -thymidineのDNAへの取り込み量を、同時に行った5%LDP・MEM培地に対する比で表した。

IV. 結果

【実験1】

対象の血漿およびLDL分画中のTC, TG値はTable 1に示すごとくで各高脂血症表現型の特徴が認められた。LDLの脂質組成の重量比(平均値)を検討すると(Fig. 1)、ECはIIa、FH群で高値、N、IIb、IV群で低値であり、逆に、TGはIIb、IV群で、蛋白はN、IIb、IV群で高値であった。そこでEC、TGおよび蛋白の重量比を詳細に検討し、Fig. 2に示した。ECはIIa、FH群がN、IIb、IV群に比し有意に高値、TGはIV群がN、IIa、FH群に比し有意に高値、IIb群がN群に比し有意に高値であった。蛋白はTGと同様の傾向で、IIb、IV群で高値であった。すなわち、血清TGの増加しているIIb、IV型のLDLはEC含量に乏しく、相対的にTGおよび蛋白に富んでおり、IIa型、FHのLDLはその逆の脂質組成であった。N群はこれらの中間に位置していた。このような脂質組成の異なるLDLを用いてSMCの ^3H -thymidineのDNAへの取り込みに及ぼす作用について検討した。

SMCの ^3H -thymidineのDNAへの取り込みに対する各群のLDLの影響をFig. 3に示した。LDLを添加しない5%LDP・MEM培地での ^3H -thymidineの取り込み量は、16回の実験で $2689 \pm 1610\text{cpm}$ (Mean \pm SD)であった。5%LDP・MEM培地に対する各群の ^3H -thymidineのDNAへの取り込み量の比の平均値は、N群 $117 \pm 6\%$ 、IIa群 $127 \pm 18\%$ 、IIb群 $111 \pm 13\%$ 、FH群 $134 \pm 18\%$ 、IV群 $122 \pm 27\%$ であり、FH群がN群、IIb群に比して有意(それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$)に高値で

あった。

LDL-E C濃度と ^3H -thymidineのDNAへの取り込み量の関係を検討すると(Fig. 4)、LDL-E C濃度の上昇に従って取り込み量の増加が認められ、有意な正相関($p<0.01$)を示した。一方、LDL-E Cの重量比とも同様の関係が認められた(Fig. 5)。しかし、重量比との関係は、単なるE C濃度との関係と異なり、より強い相関($p<0.001$)が得られた。LDL-TGの重量比と ^3H -thymidineの取り込み量の関係は、E Cとの関係とは異なり、負相関($p<0.05$)を示した(Fig. 6)。

各群における脂質及び蛋白の濃度と ^3H -thymidineのDNAへの取り込み量の関係をTable 3に示した。全体ではE CおよびPL濃度と正相関が得られたが、群に分けてみると、必ずしも正相関の傾向は得られなかった。これに対し、各群における脂質及び蛋白の重量比と ^3H -thymidineのDNAへの取り込み量の関係をみると(Table 4)、LDL-E Cの重量比と取り込み量は全ての群で正相関の傾向がみられた。逆にLDL-TGの重量比との関係は、N群を除いて負の相関傾向が得られた。すなわち、E Cに富み相対的にTGに乏しいLDLほど ^3H -thymidineのDNAへの取り込みには促進的に働き、逆にE Cが乏しく相対的にTGに富んだLDLは ^3H -thymidineのDNAへの取り込み作用は低いことが示された。また、この関係は、高脂血症の表現型に依存せずに認められた。

E Cに富み相対的にTGに乏しいLDLは、LDL受容体への親和性が高いと考えられている。したがって、LDLの ^3H -thymidineのDNAへの取り込みの促進作用は、受容体への結合性に影響されている可能性が考えられた。そこで、LDLの ^3H -thymidineのDNAへの取り込み促進作用がLDLの蛋白部分、すなわちLDL受容体のリガンドであるapoB-100に存在するか否かについて、次にLDLを部分的に脱脂して検討した。

【実験2】

Table 5に対象症例の血漿及びLDL分画中の脂質及び蛋白の濃度

を示した。LDLの脂質組成の検討では(Table 6)、FH例、IIa型高脂血症を呈する症例とも未治療であったが、LDLの組成は必ずしもECに富んではいなかった。一方、TGの重量比は実験1の対象症例のIIb、IV型のLDLに比し、低値であった。

脱脂LDLの脂質組成を検討すると(Table 7)、TC、TGは90%以上脱脂されたが、PLは50~80%残存していた。蛋白の回収率には一定の成績は得られなかったが、PL/蛋白の重量の比を検討すると、40~60%であった。したがって、今回用いた脱脂LDLは、コレステロールをほとんど含まず、PLと蛋白がほぼ一定のモル比で結合した溶液であると考えられた。

脱脂LDLのSDS-PAGEでは(Fig. 7)、一部 apoB-100のfragmentationによると思われるapoB-74及びapoB-26のバンドが認められたが、デンストメーターによる計測では、intactのapoB-100が90%以上保たれていた。

以上のようなコレステロールをほとんど含まず、apoB-100とリン脂質より構成される脱脂LDLを用いて、SMCの³H-thymidineのDNAへの取り込みに対する作用を検討した。脱脂LDLを蛋白量で5、10、25、50μg添加し、36時間での³H-thymidineの取り込み量を測定した。5% LDP・MEM培地での³H-thymidineのDNAへの取り込み量は、3回の実験で、 $2808 \pm 814 \text{ cpm (Mean} \pm \text{SD)}$ であった。脱脂LDL添加培地では、³H-thymidineのDNAへの取り込み量は、脱脂LDLの濃度依存性に増加していた(Fig. 8)。脱脂LDLの蛋白量25および50μgの添加では、5μgの添加に比して取り込み量は有意に高値であった。

以上の実験結果より、コレステロールをほとんど含まない脱脂LDLを用いても、SMCの³H-thymidineのDNAへの取り込みの促進が認められた。

V. 考案

実験1の結果より、LDLの³H-thymidineのDNAへの取り込みの

促進作用には、LDL-EC濃度とLDL粒子の脂質組成が関係していると考えられた。Aviramらは²³⁾、リパーゼで処理したTG含量の乏しいLDLは、処理しないLDLに比べて、マクロファージやSMCのLDL受容体に親和性が高いことを報告している。また、家族性複合型高脂血症(FCHL)やHyperapobetalipoproteinemia(HyperapoB)では、小さく、密度の高いLDLの存在が報告され、その脂質組成はECに乏しく、TGおよび蛋白に富んでいる²⁴⁻²⁶⁾。TG-rich lipoproteinの増加するIV型やV型高脂血症のLDLもHyperapoBやFCHLと同様の脂質組成を示し、このような脂質組成のLDLはLDL受容体への親和性が低下していると報告されている^{27, 28)}。また、LDLの亜分画を用いた kinetic study によると²⁹⁾、dense fraction に対して、コレステロールに富んだ buoyant fraction において異化速度が速いことが認められている。さらに、LDLの亜分画とapoB抗体の免疫反応性をみた実験によると³⁰⁾、亜分画の密度とレセプター認識部位に対するapoB抗体の免疫反応性との間に逆相関が認められた。すなわち、密度の高い亜分画ほどapoB抗体との反応性が低下していた。以上の報告より、LDL粒子とLDL受容体の親和性は、apoBの異常がない限り、粒子の密度と大きさにより規定されていると考えられる。

LDL粒子の密度は、上述したようにECとTGおよび蛋白の相対的な比率で決定される。今回の成績では高脂血症の表現型に関係なくECに富み、相対的にTGに乏しいLDLにおいてSMCの³H-thymidineのDNAへの取り込みの促進作用が強く認められた。このことは、密度と大きさに規定されるLDL受容体への親和性の差異が、SMCの³H-thymidineのDNAへの取り込みにも影響した可能性が考えられた。すなわち、LDLのthymidineのDNAへの取り込みに対する作用は、コレステロールの関与のみではなく、受容体への結合性に影響されることが考えられた。このことを検討する目的で、LDL受容体のリガンドであるapo-B 100にthymidineのDNAへの取り込みの促進作用が存在するか否かについて、実験2を行った。

実験2では、コレステロールをほとんど含まない脱脂LDLを用いても、SMCの ^3H -thymidineのDNAへの取り込みの促進が認められた。FrostegårdらのU937細胞を用いた報告³¹⁾によると、LDL添加により細胞は増殖したが、LDLと同様の脂質組成のリポソームの添加では増殖が認められなかった。またLDLをメチル化してLDL受容体への結合を阻害すると、細胞の増殖は著しく抑制された。さらに、apoB-100のmutationのためLDL受容体への親和性が低下し、高コレステロール血症を呈する疾患である、Familial defective apolipoprotein B-100³²⁾の患者のLDLを添加すると、U937細胞の増殖は、正常者LDLの約30%に抑制された。この報告より、LDLによるU937細胞の増殖促進作用には、LDL受容体のリガンドであるapoB-100が必須であると考えられる。今回のSMCを用いた成績でも、脱脂LDLにより、 ^3H -thymidineのDNAへの取り込みの促進が認められた。このことは、残存したPLの作用も否定できないが、apoB-100自体に ^3H -thymidineのDNAへの取り込みの促進作用が存在する可能性が考えられた。したがって、LDLのthymidineのDNAへの取り込みの促進作用は、コレステロールの供給という機序のみによるのではなく、apoB-100がLDL受容体に結合することや、細胞内で代謝を受けることが、SMCの ^3H -thymidineのDNAへの取り込みの亢進をもたらした可能性が考えられた。

PDGF³³⁾を初めとして、多くの細胞増殖因子は、細胞内情報伝達にイノシトールリン酸代謝回転系を介することが知られている。Blockら³⁴⁾は、ヒト血小板、ラットSMC、ヒト胎児肺線維芽細胞において、LDLがイノシトールリン酸代謝回転系の活性化反応を引起すことを見いだした。また、Scott-Burdenら³⁵⁾は、ヒトSMCにおいて、LDLは、 S_6 -kinaseの活性化などのイノシトールリン酸代謝回転系の活性化反応を惹起することを示した。これらの報告より、LDL受容体はLDLを細胞内に取り込む機能のみではなく、イノシトールリン酸代謝回転系を介した様々な生物作用をもたらすことが考えられる。このような細胞内情報伝達系の活性化反応が、apoB-100の受容体結合によりもた

らされるか否かについては、今後の検討が必要と思われた。

VI. 結論

培養 SMC の ^3H -thymidine の DNA への取り込みに及ぼす LDL の作用を検討した結果、取り込み量は LDL 添加により促進された。この作用は、LDL-E C 濃度と有意な正相関を示した。一方、LDL-E C の重量比とも、より強い正相関が認められ、LDL-TG の重量比との関係は有意な負相関を示した。また、この重量比との関係は、高脂血症の表現型に依存せずに認められた。

このように、LDL の脂質組成差により、 ^3H -thymidine の DNA への取り込みの促進作用が異なったが、これは、LDL 受容体への親和性の差異によると考えられた。そこで、LDL の ^3H -thymidine の DNA への取り込みの促進作用が LDL 受容体のリガンドである apoB-100 に存在するか否かについて、脱脂 LDL を用いて検討した。

脱脂 LDL は、コレステロールをほとんど含まない粒子であるが、濃度依存性に SMC の ^3H -thymidine の DNA への取り込みを促進した。このことより、LDL による ^3H -thymidine の DNA への取り込みの促進は、コレステロールの関与のみではないことが示された。

実験 1 及び 2 の結果より、LDL による SMC の thymidine の DNA への取り込みの促進作用は、コレステロールのみではなく、apoB-100 も関与していることが示された。すなわち、apoB-100 が LDL 受容体に結合することや、細胞内で代謝を受けることが、SMC の thymidine の DNA への取り込みの亢進をもたらした可能性が示唆された。

References

1. Ross, R. 1986. The pathogenesis of atherosclerosis—An update. *N. Engl. J. Med.* 314:488-500.
2. Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. and Harker, L. 1974. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:1207-1210.
3. Leibovich, S. J. and Ross, R. 1976. A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. *Am. J. Pathol.* 84:5601-513.
4. DiCorleto, P. E. and Bowen-Pope, D. F. 1983. Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:1919-1923.
5. Seifert, R. A., Schwartz, S. M. and Bowen-Pope, D. F. 1984. Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature.* 311:669-671.
6. Keys, A., Aravanis, C., Blackburn, H., van Buchem, F. S. P., Buzina, R., Djordjevic, B. S., Fidanza, F., Karvonen, M. J., Menotti, A., Puddu, V. and Taylor, H. L. 1972. Probability of middle-aged men developing coronary heart disease in five years. *Circulation.* 45:815-828.
7. Kannel, W. B., Castelli, W. P., Gordon, T. and McNamara, P. M. 1971. Serum cholesterol, lipoproteins and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Ann. Intern. Med.* 74:1-12.
8. Fischer-Dzoga, K., Fraser, R. and Wissler, R. W. 1976.

Stimulation of proliferation in stationary primary cultures of monkey and rabbit aortic smooth muscle cells, Part 1 (Effects of lipoprotein fractions of hyperlipidemic serum and lymph). *Exp.Mol.Path.*24:346-359.

9.Fless,G.M.,Kirchhausen,T.,Fischer-Dzoga,K., Wissler,R.W.and Scanu,A.M.1982. Serum low density lipoproteins with mitogenic effect on cultured aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*.41:171-183.

10.Libby,P.,Miao,P.,Ordovas,J.M.and Schaefer,E.J. 1985. Lipoprotein increase growth of mitogen-stimulated arterial smooth muscle cells. *J.Cell.Physiol.*124:1-8.

11.垂井清一郎. 1986.総括報告. 原発性高脂質血症調査研究班昭和60年度研究報告書:11-20.

12.Hatch,F.T.and Lees,R.S.1968. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv.Lipid Res.*6:1-68.

13.Richmond,R.1973.Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp.and its application to enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin.Chem.*19:1350-1356.

14.Allain,C.C.,Poon,L.S.,Chan,C.S.G.,Richmond,W.and Fu,P.C.1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin.Chem.*20:470-475.

15.Buccolo,G.and David,H.1973. Quantitative determination of serum triglyceride by the use of enzyme. *Clin.Chem.*19:476-482.

16.Takayama,M.,Itoh,S.,Nagasaki,T.and Tanimizu,I. 1977. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin.Chem.*

Acta.79:93-98.

17.Lowry,O.H.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.L.and Randall,R.J.1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem.193:265-275.

18.Avogaro,P.,Bon,G.B.and Cazzolato,G.1988. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. Arteriosclerosis.8:79-87.

19.Innerarity,T.L.and Mahley,R.W.1978. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. Biochemistry.17:1440-1447.

20.Kane,J.P.,Hardman,D.A.and Paulus,H.E.1980. Heterogeneity of apolipoprotein B:Isolation of a new species from human chylomicrons. Proc.Natl.Acad.Sci.USA.77: 2465-2469.

21.Ross,R.1971.The smooth muscle cell II.Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. J.Cell.Biol.50:172-186.

22.Oikawa,S.,Hori,S.,Sano,R.,Suzuki,N.,Fujii,Y.,Abe,R and Goto,Y.1987. Effect of low density lipoprotein on DNA synthesis of cultured human arterial smooth muscle cells. Atherosclerosis.64:7-12.

23.Aviram,M.,Bierman,E.L.and Chait,A.1988. Modification of low density lipoprotein by lipoprotein lipase or hepatic lipase induces enhanced uptake and cholesterol accumulation in cells. J.Biol.Chem.263:15416-15422.

24.Brunzell,J.D.,Albers,J.J.,Chait,A.,Grundy,S.M., Groszek,E.and McDonald,G.B.1983. Plasma lipoproteins

in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.* 24:147-155.

25. Kwiterovich, Jr. P.O., White, S., Forte, T., Bachorik, P. S., Smith, H. and Sniderman, A. 1987. Hyperapobetalipoproteinemia in a kindred with familial combined hyperlipidemia and familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*. 7:211-225.

26. Teng, B., Thompson, G.R., Sniderman, A., Forte, T.M., Krauss, R.M. and Kwiterovich, Jr. P.O. 1983. Composition and distribution of low density lipoprotein fractions in hyperapobetalipoproteinemia, normolipidemia, and familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80:6662-6666.

27. Kleinman, Y., Eisenberg, S., Oschry, Y., Gavish, D., Stein, O. and Stein, Y. 1985. Defective metabolism of hypertriglyceridemic low density lipoprotein in cultured human skin fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 75:1796-1803.

28. Hiramatsu, K., Bierman, E.L. and Chait, A. 1985. Metabolism of low density lipoprotein from patients with diabetic hypertriglyceridemia by cultured human skin fibroblasts. *Diabetes*. 34:8-14.

29. Teng, B., Sniderman, A.D., Soutar, A.K. and Thompson, G. R. 1986. Metabolic basis of hyperapobetalipoproteinemia. Turnover of apo lipoprotein B in low density lipoprotein and its precursors and subfractions compared with normal and familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.* 77:663-672.

30. Teng, B., Sniderman, A., Krauss, R.M., Kwiterovich, Jr. P.O., Milne, R.W. and Macel, Y.L. 1985. Modulation of apo-

lipoprotein B antigenic determinants in human low density lipoprotein subclasses. J.Biol.Chem.260:5067-5072.

31.Frostegård, J., Hamsten, A., Gidlund, M. and Nilsson, J. 1990. Low density lipoprotein-induced growth of U937 cells: a novel method to determine the receptor binding of low density lipoprotein. J.Lipid Res.31:37-44.

32.Innerarity, T.L., Weisgraber, K.H., Arnold, K.S., Mahley, R.W., Krauss, R.M., Vega, G.L. and Grundy, S.M. 1987. Familial defective apolipoprotein B-100: Low density lipoproteins with abnormal reseptor binding. Proc.Natl. Acad.Sci.USA.84:6919-6923.

33.Habenicht, A.J.R., Glomset, J.A., King, W.C., Nist, C., Mitchell, C.D. and Ross, R. 1981. Early changes in phosphatidylinositol and arachidonic acid metabolism in quiescent swiss 3T3 cells stimulated to divide by pletelet-derived growth factor. J.Biol.Chem.256:12329-12335.

34.Block, J.H., Knorr, M., Vogt, E., Locher, R., Vetter, W., Groscurth, P. Qiao, B., Pometta, D., James, R., Regenass, M. and Pletscher, A. 1988. Low density lipoprotein causes general cellular activation with increased phosphatidylinositol turnover and lipoprotein catabolism. Proc.Natl.Acad.Sci.USA.85:885-889.

35.Scott-Burden, T., Resink, T.J., Hahn, A.W.A., Baur, U., Box, R.J. and Bühler, F.R. 1989. Induction of growth-related metabolism in human vascular smooth muscle cells by low density lipoprotein. J.Biol.Chem.264:12582-12589.

Table 1. Lipid analysis in normal controls and hyperlipidemic patients
(Experiment 1)

Type	n	age (M/F)	<u>Total cholesterol(mg/dl)</u>		<u>Triglycerid(mg/dl)</u>	
			plasma	LDL	plasma	LDL
Normal	8	38±12 (7/1)	182±34	106±29	86±29	17± 5
II a	7	55±13 (2/5)	277±44	188±45	119±33	31±12
II b	6	60± 7 (2/5)	259±28	164±11	224±51	37±12
FH	10	46±19 (2/8)	345±47	262±57	128±73	42±17
IV	4	52±12 (1/3)	253±22	96±38	364±21	27±13

Values are shown as mean±SD.

Table 2. Definition of the phenotype of hyperlipidemia

Phenotype	plasma		LDL	VLDL
	TC	TG	TC	TG
Normal	<220	<150	<150	<100
II a	≥220	<150	≥150	<100
II b	≥220	≥150	≥150	≥100
IV	—	1000> ≥150	<150	≥100

mg/dl

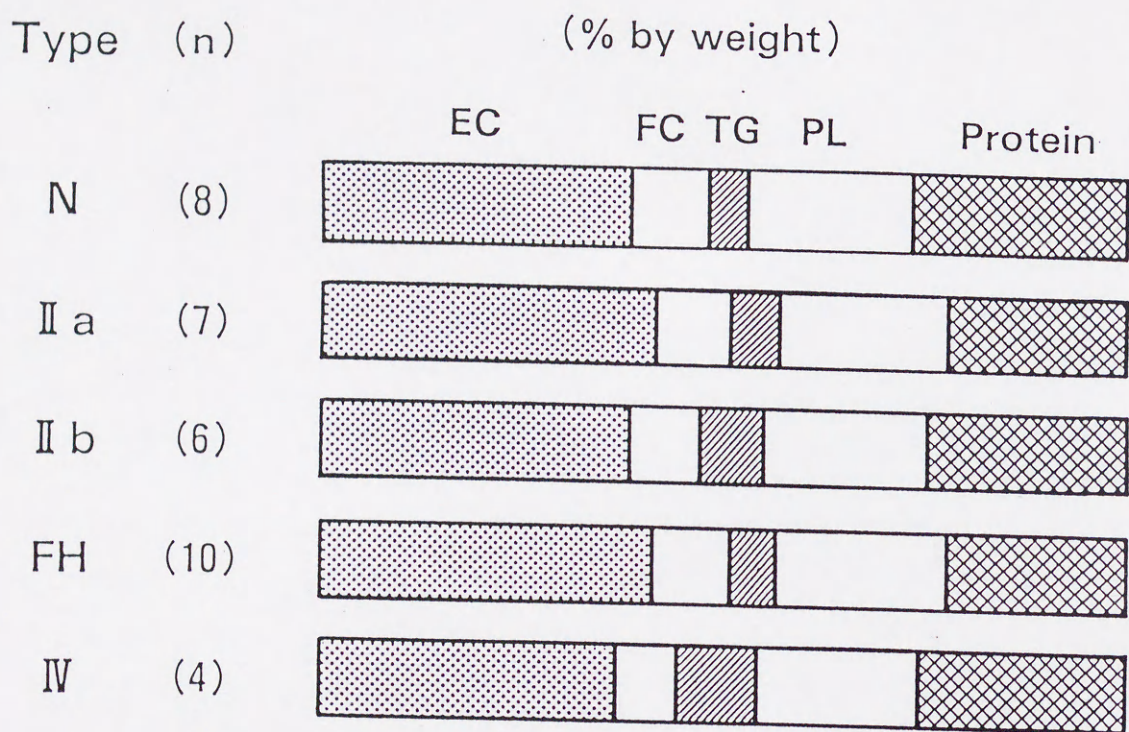


Fig.1. Composition of LDL. Normal and hyperlipidemic LDLs were analyzed for their lipid and protein content. Results are expressed as mean.

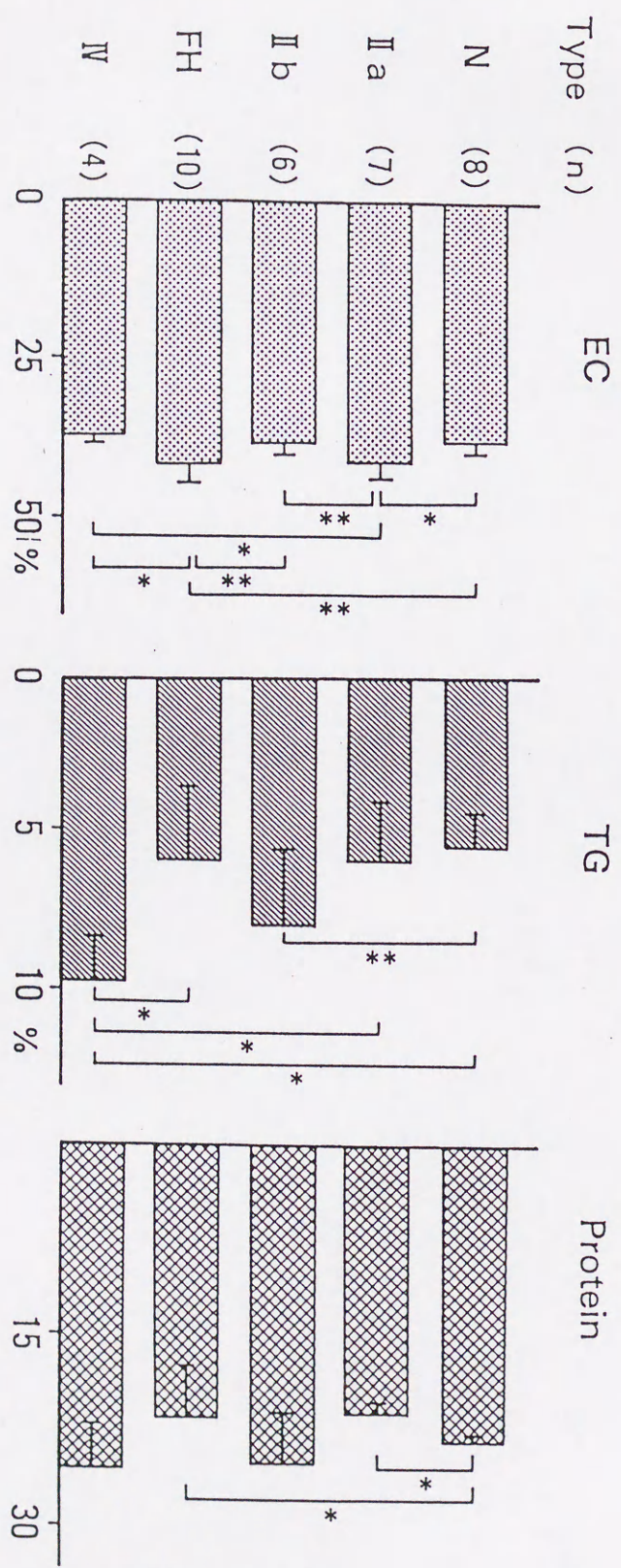


Fig.2. Comparison of LDL-composition between normal controls and hyperlipidemic patients. Results are expressed as mean \pm SD. * , $p < 0.01$, * * , $p < 0.05$.

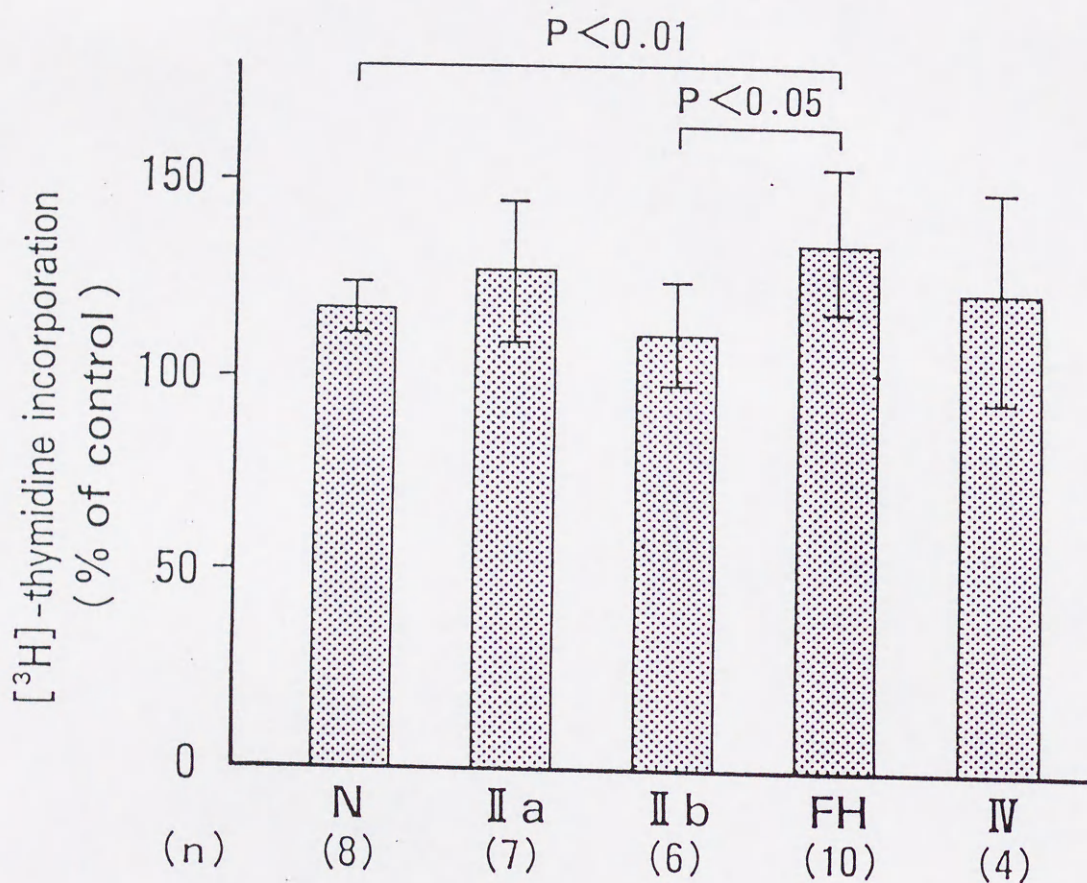


Fig.3. Effect of the normal and hyperlipidemic LDL on [³H]-thymidine incorporation into DNA on human arterial smooth muscle cells. Cells were incubated with 1ml of MEM containing 5% LDP, 25 μ g of LDL, and 0.5 μ Ci of [³H]-thymidine. After 36-hr incubation radioactivity of [³H]-thymidine incorporated into TCA insoluble fraction was determined. Results are expressed as mean \pm SD. There were significant differences in the effect between FH patients and normal subjects or type II b hyperlipidemic patients ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively).

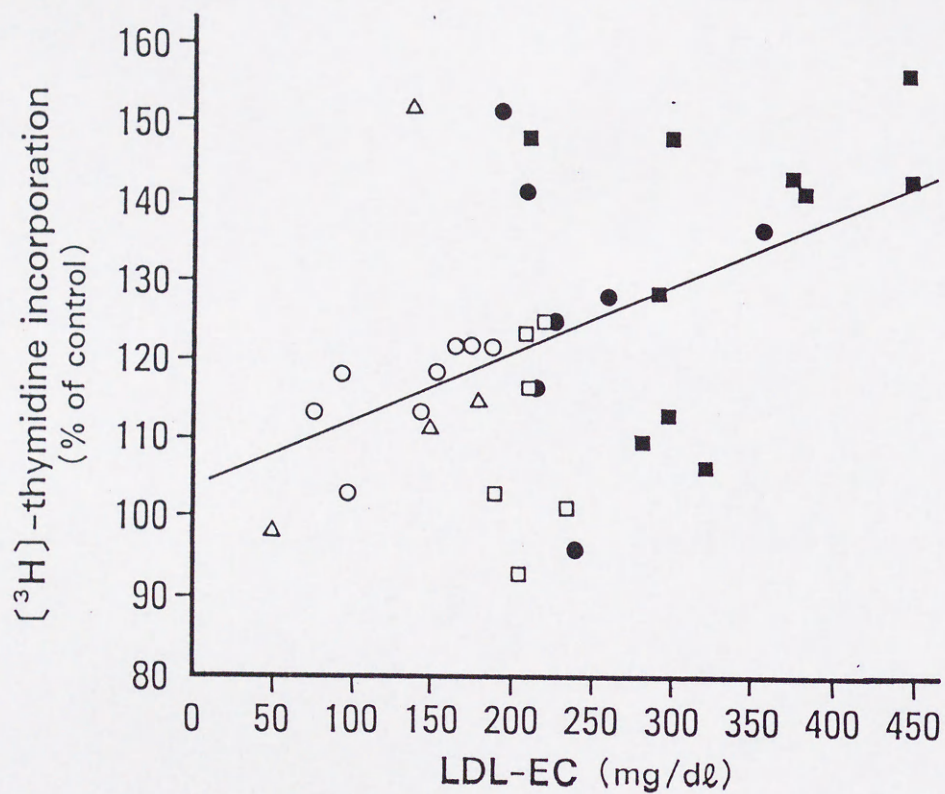


Fig.4. Correlation between DNA synthetic effect and concentration of LDL-EC. \circ , normal controls (n=8), \bullet , type II a hyperlipidemic (HLP) (n=7), \square , type II b HLP (n=6), \blacksquare , FH (n=10) and \triangle , type IV HLP (n=4) patients. $n=35$, $r=0.48$, $t=3.11$, $p<0.01$.

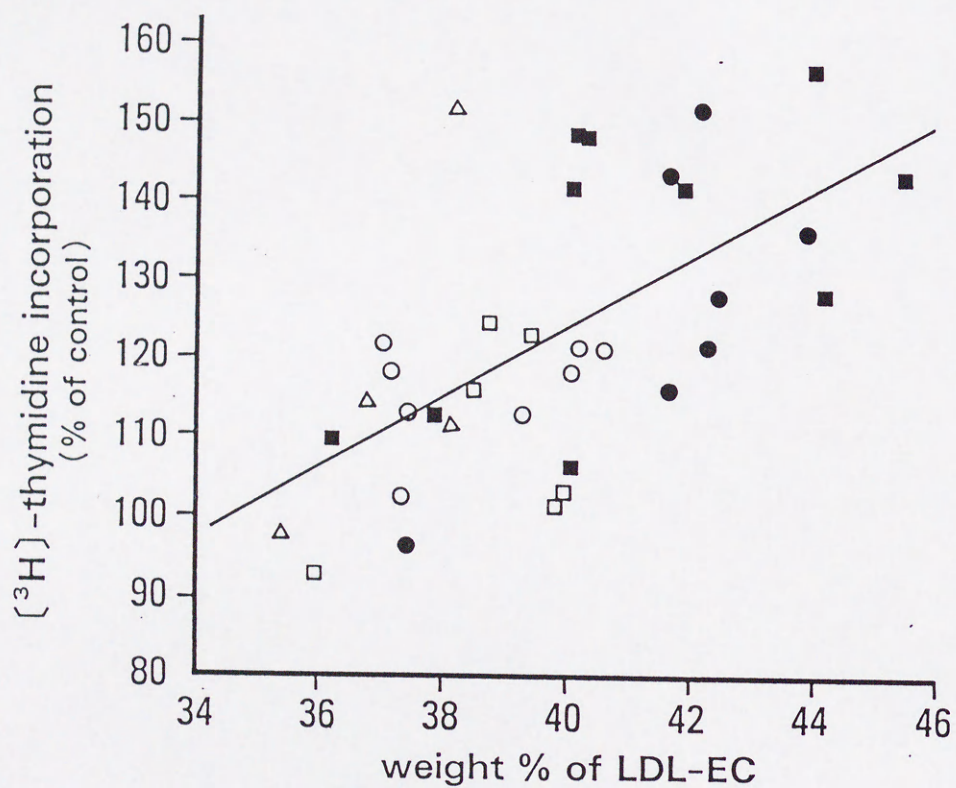


Fig.5. Correlation between DNA synthetic effect and weight % of LDL-EC. \circ , normal controls (n=8), \bullet , type II a HLP (n=7), \square , type II b HLP (n=6), \blacksquare , FH (n=10) and \triangle , type IV HLP (n=4) patients. n=35, r=0.63, t=4.65, p<0.001.

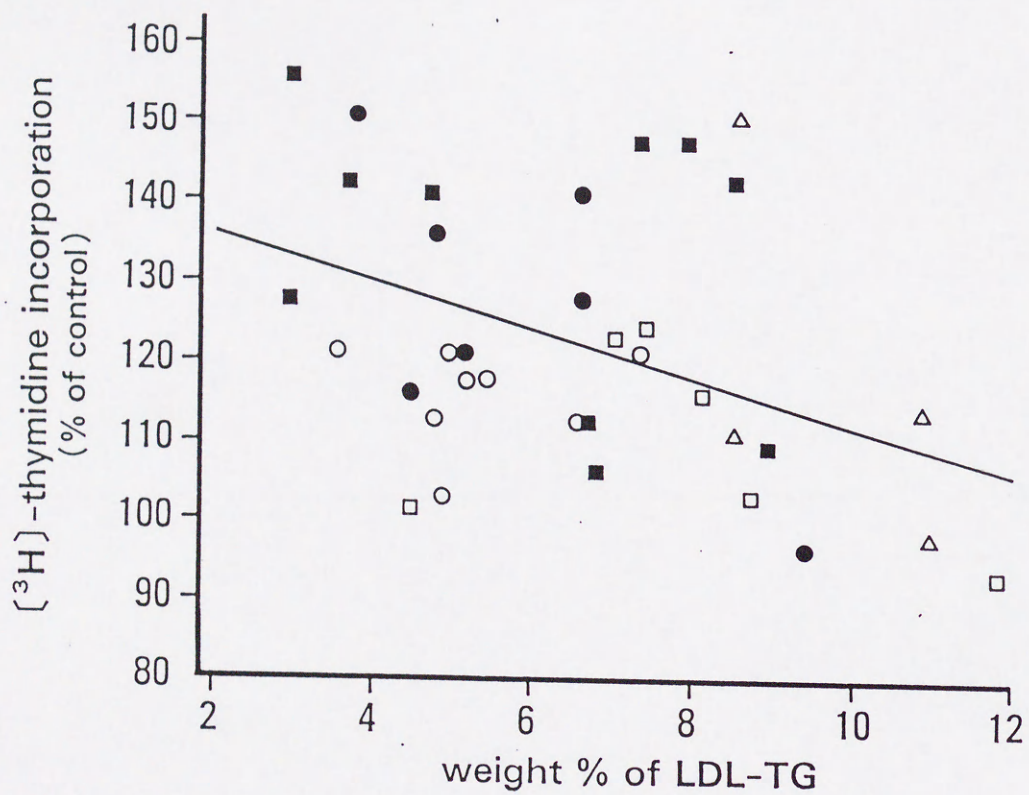


Fig.6. Correlation between DNA synthetic effect and weight % of LDL-TG. \circ , normal controls (n=8), \bullet , type II a HLP (n=7), \square , type II b HLP (n=6), \blacksquare , FH (n=10) and \triangle , type IV HLP (n=4) patients. n=35, $r=-0.39$, $t=-2.45$, $p<0.05$.

Table 3. Univariate correlation between DNA synthetic effect and concentration of LDL-lipids and apoLDL

Type	(n)	E C	F C	T G	P L	Protein
Total	(35)	0.45 #	0.33	-0.08	0.37@	0.30
N	(8)	0.54	0.47	0.40	0.37	0.55
II a	(7)	0.08	-0.00	-0.62	0.02	-0.40
II b	(6)	-0.60	-0.42	-0.45	-0.68	0.52
F H	(10)	0.37	-0.02	-0.34	0.25	-0.09
IV	(4)	0.24	0.09	-0.01	0.08	0.29

#, $p < 0.01$, @, $p < 0.05$

Table 4. Univariate correlation between DNA synthetic effect and composition of LDL

Type	(n)	E C	F C	(% by weight)			Protein
				T G	P L		
Total	(35)	0.63 §	-0.02	-0.39 @	-0.02		-0.26
N	(8)	0.42	-0.36	0.04	-0.86 @		0.38
II a	(7)	0.76	0.28	-0.67	0.47		-0.62
II b	(6)	0.35	-0.48	-0.35	-0.70		0.84 #
F H	(10)	0.59	-0.29	-0.32	-0.11		-0.35
IV	(4)	0.72	-0.78	-0.64	-0.67		0.74

§, $p < 0.001$, #, $p < 0.01$, @, $p < 0.05$

Table 5. Lipid analysis in subjects of experiment 2

Case	Type	age	sex	Total cholesterol(mg/dl)		Triglyceride(mg/dl)	
				plasma	LDL	plasma	LDL
1	Normal	29	M	171	75	75	12
2	Normal	32	M	170	115	98	17
3	FH	47	M	298	221	122	40
4	FH	54	F	307	106	106	27
5	II a	30	F	274	91	91	20

Table 6. Composition of L D L

Case	Type	E C	F C	T G	P L	Protein
% by weight						
1	N	37.0	9.6	5.3	19.7	28.4
2	N	42.3	8.2	4.8	20.3	24.4
3	F H	38.9	8.6	6.0	19.3	27.2
4	F H	40.3	10.9	3.9	21.9	23.1
5	II a	37.1	9.6	4.0	20.6	28.7

Table 7. Lipids and protein analysis of partially delipidated L D L

Case	% of removed lipids			recovery of protein (%)	PL/Protein (w/w)
	TC	TG	PL		
1 N			28	92	0.60
2 N			37	163	0.46
3 F H	>90	>90	22	91	0.58
4 F H			51	108	0.47
5 II a			49	61	0.36

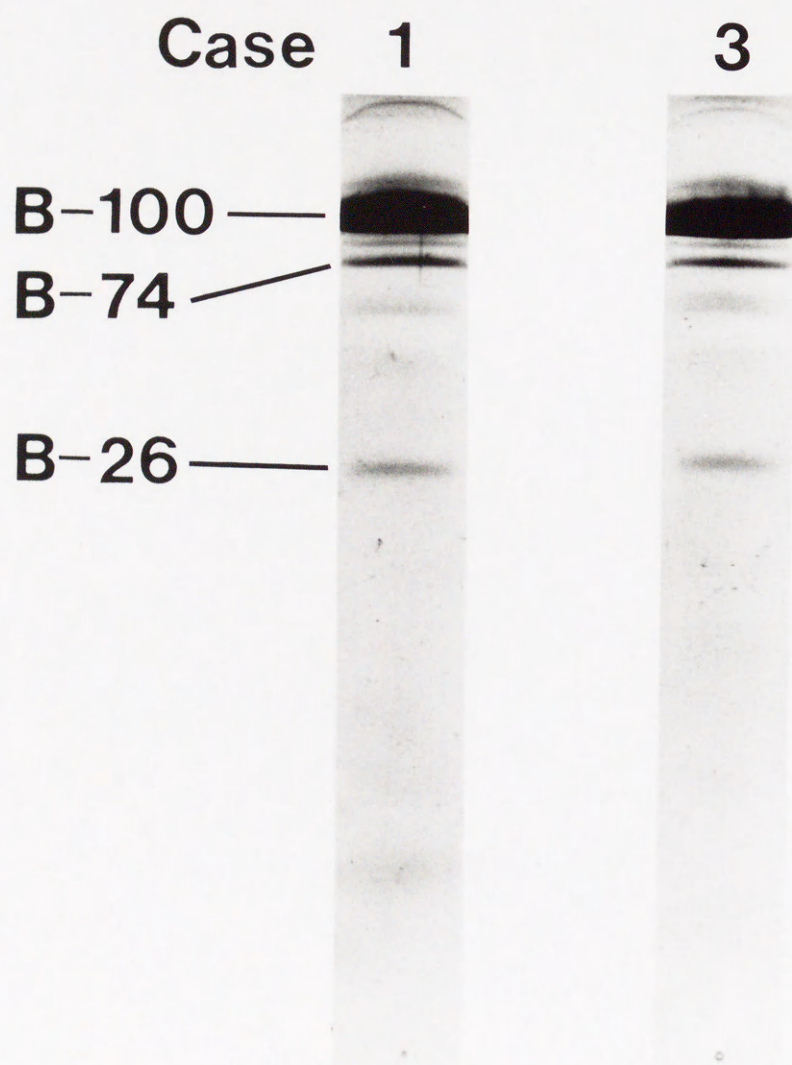


Fig.7. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of apoproteins of partially delipidated LDL.

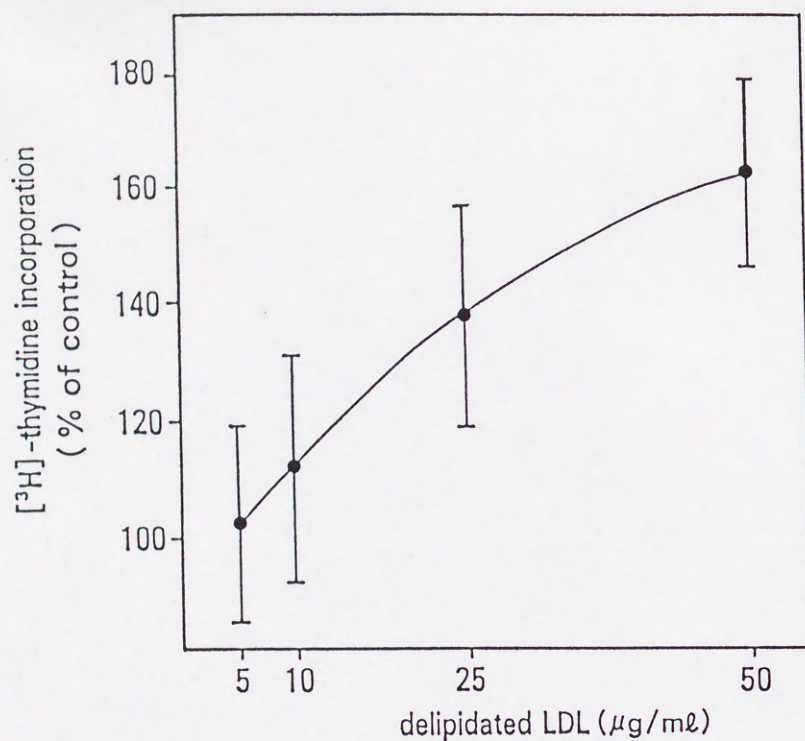


Fig.8. Effect of the partially delipidated LDL on $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation into DNA on human arterial smooth muscle cells. Cells were incubated with 1ml of MEM containing 5% LDP, indicated concentrations of partially delipidated LDL and $0.5\mu\text{Ci}$ of $[^3\text{H}]$ -thymidine. After 36-hr incubation, radioactivity of $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporated into TCA insoluble fraction was determined. Results are expressed as mean \pm SD. $n=5$.

